(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2004-317502
(P2004-317502A)
(43)公開日　平成16年11月11日(2004.11.11)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
G01N 33/564	G01N 33/564	Z	
G01N 33/53	G01N 33/53	L	

審査請求 未請求　請求項の数 14　ＯＬ　（全 14 頁）

(21)出願番号　特願2004-97115(P2004-97115)
(22)出願日　平成16年3月29日(2004.3.29)
(31)優先権主張番号　特願2003-91987(P2003-91987)
(32)優先日　平成15年3月28日(2003.3.28)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(71)出願人　390014960
シスメックス株式会社
神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号
(74)代理人　100088904
弁理士　庄司　隆
(74)代理人　100124453
弁理士　資延　由利子
(72)発明者　奥田　昌宏
神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号
シスメックス株式会社内
(72)発明者　棟尾　顕士
神戸市中央区脇浜海岸通１丁目５番１号
シスメックス株式会社内

(54)【発明の名称】抗リン脂質抗体測定試薬及び試薬キット

(57)【要約】
【課題】
抗リン脂質抗体症候群の原因物質である抗リン脂質抗体、具体的にはループスアンチコアグラント（ＬＡ）を定量的かつ確定診断する簡易な測定方法を提供することである。
【課題手段】
抗リン脂質抗体症候群の原因物質であるＬＡを含む検体とヒトを除く脊椎動物の抗体、血清、血漿及び免疫グロブリンを含む凝固試薬又は免疫学的測定試薬を使用して凝固時間又は免疫学的測定を行うことによる。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
凝固系組成物；及び
ヒトを除く脊椎動物の抗体、血清、血漿及び免疫グロブリンから成る群より選ばれる少なくとも１種；
を含む凝固時間測定試薬。
【請求項２】
前記脊椎動物は、ヒト及びブタを除くほ乳類である請求項１に記載の凝固時間測定試薬。
【請求項３】
前記凝固系組成物は、
カルシウムイオン；
リン脂質；及び
活性化剤、蛇毒、及び組織因子からなる群より選ばれる少なくとも１種；
を含む請求項１に記載の凝固時間測定試薬。
【請求項４】
前記活性化剤は、カオリン、セライト、シリカ及びエラグ酸からなる群より選ばれる１種である請求項１に記載の凝固時間測定試薬。
【請求項５】
前記凝固時間測定試薬は、第１部分試薬と第２部分試薬とからなり、
第１部分試薬には、
ヒトを除く脊椎動物の抗体、血清、血漿及び免疫グロブリンから成る群より選ばれる少なくとも一種；
リン脂質；及び
活性化剤、蛇毒、及び組織因子からなる群より選ばれる少なくとも１種が含まれ
第２部分試薬には、
カルシウムイオンが含まれている請求項３に記載の凝固時間測定試薬。
【請求項６】
凝固系組成物；並びにヒトを除く脊椎動物の抗体、血清、血漿及び免疫グロブリンから成る群より選ばれる少なくとも１種を含む第１凝固時間測定試薬と、
凝固系組成物を含むが、ヒトを除く脊椎動物の抗体、血清、血漿及び免疫グロブリンのいずれも含まない第２凝固時間測定試薬と
からなる抗リン脂質抗体の検出試薬キット。
【請求項７】
第１凝固時間測定試薬に含まれる凝固系組成物の組成と、第２凝固時間測定試薬に含まれる凝固系組成物の組成は、同一である請求項６に記載の検出試薬キット。
【請求項８】
前記抗リン脂質抗体は、ヒトループスアンチコアグラントである請求項６に記載の検出試薬キット。
【請求項９】
前記第１凝固時間測定試薬は、第１部分試薬と第２部分試薬とからなり、
第１部分試薬には、
ヒトを除く脊椎動物の抗体、血清、血漿及び免疫グロブリンから成る群より選ばれる少なくとも一種；
リン脂質；及び
活性化剤、蛇毒、及び組織因子からなる群より選ばれる少なくとも１種が含まれ
第２部分試薬には、
カルシウムイオンが含まれ、
前記第２凝固時間測定試薬は、第３部分試薬と第４部分試薬とからなり、
第３部分試薬には、
リン脂質；及び

活性化剤、蛇毒、及び組織因子からなる群より選ばれる少なくとも１種が含まれ
第４部分試薬には、
カルシウムイオンが含まれている
請求項６に記載の検出試薬キット。
【請求項１０】
検体を第１凝固時間測定試薬及び第２凝固時間測定試薬それぞれと接触させる工程；及び
第１凝固時間測定試薬と混合したときの凝固時間（第１凝固時間）と、第２凝固時間測定試薬と混合したときの凝固時間（第２凝固時間）とを比較する工程
を含む抗リン脂質抗体の検出方法。
【請求項１１】
前記比較した結果、第１凝固時間と第２凝固時間との間に有意な差があれば、抗リン脂質抗体が被検物中に含有されていると判定する工程を、更に含む請求項１０に記載の検出方法。
【請求項１２】
測定された第１凝固時間及び第２凝固時間から下記式に基づいて算出される阻害比率の値が１．２以上の場合には、抗リン脂質抗体が被検物中に含有されていると判定する工程を、更に含む請求項１０に記載の検出方法。
阻害比率　＝１－（第２凝固時間－第１凝固時間）／第１凝固時間
【請求項１３】
前記第１凝固時間測定試薬は、少なくとも、被検物1mLに対する、ヒトを除く脊椎動物の抗体、血清、血漿及び免疫グロブリンの総量が0.1mg～50mgとなる量を使用する請求項１０に記載の検出方法。
【請求項１４】
標識された、ヒトを除く脊椎動物の抗体、血清、血漿又は免疫グロブリン（標識非ヒト由来抗体等）と、被検体とを接触させる工程；及び
前記被検体のうち、前記標識非ヒト由来抗体等との結合物を、該標識を測定することにより測定する工程を含む抗リン脂質抗体測定方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、臨床化学や医薬研究などの分野において抗リン脂質抗体症候群の診断に用いられる血液凝固試薬及び該試薬を用いる試薬キットに関し、さらに詳しくはin vitroでの血液検査でループスアンチコアグラント陽性疾患を高精度に且つループスアンチコアグラントを定量可能に検出できる試薬、試薬キット、及び抗リン脂質抗体検出方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
抗リン脂質抗体はカルジオリピン、ホスファチジルセリン、フォスファチジン酸などの陰性荷電をもった脂質に対する自己抗体の総称であり、代表的なものにはループスアンチコアグラント(lupus anticoagulant:以下「LA」ともいう)がある。抗リン脂質症候群(antiphospholipid syndrome: 以下「APS」ともいう)とは、上記抗リン脂質抗体が陽性で、血栓症・流早産・血小板減少などの特有な臨床症状を示す疾患の総称である。
【０００３】
抗リン脂質抗体症候群の原因物質の一種であるLAは不均一な抗体であり、その抗原は、陰性荷電リン脂質（ホスファチジルセリン）と、β2-GPIをコファクター又はプロトロンビンとの複合体に対する抗体であることが近年明らかになった。LAの抗凝血作用は、LAがこの複合体と結合することによりプロトロンビンがトロンビンに変化することを阻害するために起こると考えられる。また、LAは個々の凝固因子活性を抑制することなく、リン脂質依存性の凝固反応を阻害する免疫グロブリンであることも知られている（臨床検査法提要,金原出版,改定第31版,442頁）。

【０００４】
このような特徴を有するLAの検出用試薬としては、従来より一定量のリン脂質を含有する凝固試薬、例えば、ウサギ脳由来セファリン、ウシ脳由来セファリン、大豆レシチン、蛇毒などが用いられている。検体血液中にLAが存在すると、LAが試薬中のリン脂質を中和してしまうため、検体を凝固するカスケード反応の開始に必要なリン脂質が不足することになることから、LAにより中和されたリン脂質の量に比例して、各検査の凝固時間が延長し、これをもってLA陽性と診断することができる。
【０００５】
また、凝固試薬中のリン脂質が少ないほど、LAの検出感度が高まるので、試薬を希釈したり、リン脂質濃度が異なる試薬の組合わせ（試薬キット）を用いることが行われている。
【０００６】
例えば、リン脂質の濃度が異なる２つの試薬を組合わせた活性化部分トロンボプラスチン時間測定（以下、APTTと略称する）試薬を使用し、各試薬の凝固時間から、ロスナーインデックス(Rosner Index)やループス比(Lupus Ratio:LR)を算出し、LA陽性率を判定する手法が知られている。
市販の凝固測定試薬としては、グラディポアLA(Gradipore社；オーストラリア)というラッセル蛇毒法による検査試薬や、ヘキサゴナルホシファチジルエタノールアミンを用いるスタクロットLA法（ロッシュ社）がある。
【０００７】
さらに、既存の研究報告によれば(V. Chantarangkul, et.al., Thromb. Res. 1992, 67: 355-365（非特許文献１）; E. Rosner, et.al., Thromb. Haemost. 1987, 57: 144-149（非特許文献２）)、ウサギ脳由来リン脂質などによるリン脂質濃度の差を利用して、算術的にLAの検出が行なわれている。
【０００８】
これらの方法はいずれもスクリーニングあるいは定性的な検査方法であり、しかも、検出試薬は抗リン脂質抗体又はループスアンチコアグラントのみに特異的に反応するのではなく、他の成分とも反応してしまうため、カットオフ値等の設定によっては、LA陽性でない場合にも陽性と判断してしまったり、逆に、検出試薬に対する感応性が低い患者に対しては、LA陽性であるにもかかわらず、陰性と判定してしまう場合がある。
【０００９】
診断精度を上げるために、抗リン脂質抗体あるいはループスアンチコアグラントに由来する免疫グロブリンを、定量あるいは特異的に検出できる試薬及び検出方法が望まれている。
【００１０】
抗リン脂質抗体を定量的に測定する方法としては、免疫学的測定法であるβ2GPI依存性抗カルジオリピン抗体測定法が開発されているが、この方法は抗カルジオリピン抗体を直接測定する方法ではない。
【００１１】
このような状況から、国際血栓止血学会(ISTH)ではBrandtらがループスアンチコアグラントのガイドライン(Thromb Haemost 1995;74(4):1185-90（非特許文献３）)を作成し、抗リン脂質抗体症候群(APS)の診断のためのサッポロクライテリア(Arthritis Rheum 1999;42(7):1309-11（非特許文献４）)を制定した。これらによれば、APSあるいはLAの診断は、１つの測定原理に基づく方法で行うのではなく、２又は３種の異なる測定原理を用いた検査方法を組み合わせることを勧告している。
【００１２】
一方、特異性を利用して、高精度に検出する方法として、ホシファチジルセリン依存性抗プロトロンビン抗体を測定する方法(Arthritis Rheum 2000;43(9):1982-93（非特許文献５）)が報告されてきたが、この方法は免疫学的測定法であるため、凝固検査法のように簡易に測定できない。

【００１３】
【非特許文献１】Thromb Res 1992;67:355-65
【非特許文献２】Thromb. Haemost. 1987, 57: 144-149
【非特許文献３】Thromb Haemost 1995;74(4):1185-90
【非特許文献４】Arthritis Rheum 1999;42(7):1309-11
【非特許文献５】Arthritis Rheum 2000;43(9):1982-93
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【００１４】
本発明の目的は、比較的簡易に測定できる凝固検査法で、抗リン脂質抗体症候群の原因物質である抗リン脂質抗体、具体的にはLAを、高精度に検出できる凝固時間測定試薬、及びこれを用いた試薬キットを提供することにある。
また本発明は、上記試薬キットを用いて、抗リン脂質抗体を簡易に高精度に検出する方法を提供する。
さらに、本発明は、検体中の抗リン脂質抗体を定量可能な程に、特異的に測定する方法を提供する。
【課題を解決するための手段】
【００１５】
本発明者らは、種々検討の結果、抗リン脂質抗体症候群の原因物質である抗リン脂質抗体、特にLAが、マウスIgG、ウマIgG、HBR、NMS、MAK33、マウス血清、ウマ血清などの、ヒトを除く脊椎動物の抗体等と特異的に結合し、抗リン脂質抗体と検体に含まれているリン脂質との結合を阻止することを見出し、本発明を完成するに至った。
【００１６】
すなわち本発明の凝固時間測定試薬は、凝固系組成物；及びヒトを除く脊椎動物の抗体、血清、血漿及び免疫グロブリンから成る群より選ばれる少なくとも１種を含む。
【００１７】
本発明の抗リン脂質抗体の検出試薬キットは、上記本発明の凝固時間測定試薬（第１凝固時間測定試薬）と、凝固系組成物を含むが、ヒトを除く脊椎動物の抗体、血清、血漿、免疫グロブリンのいずれも含まない第２凝固時間測定試薬とからなる。
【００１８】
本発明の抗リン脂質抗体の検出方法は、検体を第１凝固時間測定試薬及び第２凝固時間測定試薬それぞれと接触させる工程；及び第１凝固時間測定試薬と混合したときの凝固時間（第１凝固時間）と、第２凝固時間測定試薬と混合したときの凝固時間（第２凝固時間）とを比較する工程を含む。
【００１９】
また、本発明の抗リン脂質抗体測定方法は、標識された、ヒトを除く脊椎動物の抗体、血清、血漿及び免疫グロブリンから成る群より選ばれる少なくとも１種（標識非ヒト由来抗体等）と、被検体とを接触させる工程；及び前記被検体のうち、前記標識非ヒト由来抗体等との結合物を、該標識を測定することにより測定する工程を含む。
【００２０】
〔凝固時間測定試薬〕
本発明の凝固時間測定試薬は、凝固系組成物；並びにヒトを除く脊椎動物の抗体、血清、血漿及び免疫グロブリンから成る群より選ばれる少なくとも１種を含む。
【００２１】
凝固系組成物とは、in vitroで血液凝固を起こすのに必要な成分をいい、カルシウム；リン脂質；並びに活性化剤、蛇毒、及び組織因子からなる群より選ばれる少なくとも１種を含んでいる。
【００２２】
リン脂質としては、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリンなどが挙げられ、これらのうち１種又は２種以上の組合せを含むことがで

きる。

【００２３】

活性化剤としては、カオリン、セライト、シリカ及びエラグ酸からなる群より選択される１種以上を用いることが好ましい。蛇毒としては、ラッセル蛇毒、テキスタリン蛇毒及びエカリン蛇毒からなる群より選択される１種以上を用いることが好ましい。組織因子としては、ウサギ脳、ヒト組換え体などを用いることが好ましい。

【００２４】

活性化剤、蛇毒、及び組織因子のうち、いずれを用いるかは、凝固時間測定試薬の種類に応じて適宜選択される。例えば、カルシウム、リン脂質及び活性化剤を含む場合には活性化部分トロンボプラスチン時間測定(APTT)試薬に該当する。カルシウム、リン脂質及び蛇毒を含む場合には、ラッセル蛇毒測定時間(RVVT)試薬に該当する。また、カルシウム、リン脂質及び組織因子を含む場合には、プロトロンビン時間測定(PT)試薬に該当する。

【００２５】

本発明の凝固時間測定試薬における凝固系組成物の含有率は、被検体たる血液又は血漿の凝固を開始することができる量であればよく、被検体との混合率に応じて、適宜選択される。

【００２６】

ヒトを除く脊椎動物の抗体、血清、血漿及び免疫グロブリンから成る群より選ばれる少なくとも１種は、検出対象である抗リン脂質抗体を捕捉する捕捉剤として、本発明の凝固時間測定試薬に含有される。すなわち、本発明で検出対象となる抗リン脂質抗体、具体的には、ヒトループスアンチコアグラント(ヒトLA)は、ヒトを除く脊椎動物の抗体、血清、血漿及び免疫グロブリンと結合して、凝固系組成物により開始される凝固時間における抗リン脂質抗体の影響を排除することができる。その結果、抗リン脂質抗体による凝固時間の延長を阻止することができる。

【００２７】

抗リン脂質抗体を捕捉するために含有されるヒトを除く脊椎動物の抗体、血清、血漿又は免疫グロブリン（以下、これらを区別せず、総称して述べるときは「非ヒト由来抗体等」という）としては、好ましくはヒト及びブタを除くほ乳類の抗体、血清又は免疫グロブリンが用いられ、具体的には、マウスIgG、ウマIgG、ウシIgG、マウス血清、ウマ血清、ウシ血清、マウス、ウマ又はウシのα－グロブリンなどを用いることができる。市販品としては、Scantibodies社製のHBR(Heterophile Blocking Reagent) や、MAK33 (ロッシュ社製)、NM8などがある。HBRは、免疫測定方法における異好性抗体による干渉を抑制することを目的として検査系に添加される試薬であるが、本発明者により、抗リン脂質抗体症候群の原因となる抗リン脂質抗体、特にLAに特異的に結合し、しかも、血液検体中に含まれる抗リン脂質抗体以外の血液凝固時間に関連する成分とは結合しないことが見出され、本発明の凝固時間測定試薬における抗リン脂質抗体捕捉剤としての使用が可能となった。

【００２８】

抗リン脂質抗体を捕捉するために含有される非ヒト由来抗体等としては、１種類の動物由来の抗体等だけを用いてもよいし、異なる２種以上の動物由来の抗体等、例えばマウスIgGとウマIgGを混合して用いてもよい。

【００２９】

本発明の凝固時間測定試薬における非ヒト由来抗体等の含有量は、被検体 mL当たり0.1～50mg、好ましくは0.2～10mg、より好ましくは0.5～6mgとなる量を含有させることが好ましい。測定試料1mLあたり、0.1mg以下では、抗リン脂質抗体症候群患者の検体の場合に、抗リン脂質抗体の捕捉が不十分となり、捕捉されなかった抗リン脂質抗体により凝固時間の延長が認められるからである。

【００３０】

本発明の凝固時間測定試薬には、上記成分（凝固系組成物並びに非ヒト由来抗体等）以外に、必要に応じて、HEPES及びTris緩衝液などの緩衝液を含んでもよい。緩衝液の濃度は、一般的に臨床化学の分野で用いられている濃度であればよく、簡単な繰り返し実験に

より決定することができる。また、本発明の凝固時間測定試薬には、さらに、α-グロブリンのようなタンパク質が含有されていてもよい。

【００３１】

以上のような組成を有する凝固時間測定試薬は、上記成分の混合物として１つの容器に収納されていてもよいし、別々の容器に収納された第１部分試薬と第２部分試薬との組合せであってもよい。この場合、第１部分試薬には、非ヒト由来抗体を除く脊椎動物の抗体、血清、血漿及び免疫グロブリンから成る群より選ばれる少なくとも一種；リン脂質；及び活性化剤、蛇毒、及び組織因子からなる群より選ばれる少なくとも一種が含まれ、第２部分試薬には、カルシウムイオンが含まれる。

【００３２】

〔検出試薬キット〕

本発明の検出試薬キットは、血液又は血漿検体における抗リン脂質抗体、特にヒトループスアンチコアグラント（ヒトLA）の含有の有無を高精度に検出するための試薬キットである。対象となるヒトLAは、IgG、IgM、IgAクラスのいずれであってもよい。

【００３３】

本発明の検出試薬キットは、上記本発明の凝固時間測定試薬（第１凝固時間測定試薬）と、凝固系組成物を含むが、ヒトを除く脊椎動物の抗体、血清、血漿、免疫グロブリンのいずれも含まない第２凝固時間測定試薬とからなる。すなわち、本発明の検出試薬キットは、抗リン脂質抗体捕捉剤となる非ヒト由来抗体等の含有の有無だけが異なる２種類の凝固時間測定試薬の組合せである。

【００３４】

第１凝固時間測定試薬に含まれる凝固系組成物と、第２凝固時間測定試薬に含まれる凝固系組成物とは同種でなければならない。つまり、第１凝固時間測定試薬に含まれる凝固系組成物がAPTT試薬の場合には、第２凝固時間測定試薬に含まれる凝固系組成物もAPTT試薬であり、さらにその組成は、同一であることが好ましい。

【００３５】

また、第１凝固時間測定試薬が、第１部分試薬と第２部分試薬との組合せからなる場合には、第２凝固時間測定試薬も、部分試薬の組合せであることが好ましい。この場合、第１部分試薬に相当する部分試薬（第３部分試薬）には、リン脂質；及び活性化剤、蛇毒及び組織因子からなる群より選ばれる少なくとも１種が含まれ、第２部分試薬に相当する部分試薬（第４部分試薬）には、カルシウムイオンが含まれる。

【００３６】

第２凝固時間測定試薬には、抗リン脂質抗体捕捉剤となる非ヒト由来抗体等が含まれていないので、抗リン脂質抗体症候群(APS)陽性の検体では、抗リン脂質抗体(例えばLA)の存在により、凝固時間が延長される。一方、第１凝固時間測定試薬と検体を接触させた場合には、第１凝固時間測定試薬に含まれる非ヒト由来抗体等により、抗リン脂質抗体が捕捉されるので、抗リン脂質抗体症候群(APS)陽性の検体であっても、抗リン脂質抗体(例えばLA)の存在による凝固時間の延長が阻止される。従って、第１凝固時間測定試薬を用いたときの凝固時間（第１凝固時間）と第２凝固時間測定試薬を用いたときの凝固時間（第２凝固時間）との間で有意な差異が認められれば抗リン脂質抗体陽性であり、有意な差異が認められなければ、抗リン脂質抗体陰性と判定できる。

【００３７】

〔検出方法〕

本発明の抗リン脂質抗体の検出方法は、上記本発明の検出試薬キットを用いる。すなわち、検体を第１凝固時間測定試薬及び第２凝固時間測定試薬それぞれと接触させる工程；第１凝固時間測定試薬と接触したときの凝固時間（第１凝固時間）と、第２凝固時間測定試薬と接触したときの凝固時間（第２凝固時間）とを比較する工程を含む。

第１凝固時間と第２凝固時間に差異があれば、検体中に、抗リン脂質抗体、特にLAを含有していると判定する。

【００３８】

また、測定された第１凝固時間と第２凝固時間とから、下記式により抗リン脂質抗体による凝固時間の阻害比率を算出し、これに基づいて抗リン脂質抗体の有無を判定してもよい。

【００３９】

阻害比率　＝１－（第２凝固時間－第１凝固時間）／第１凝固時間

【００４０】

上記式で算出される阻害比率は、正常血漿はもちろん、抗リン脂質抗体以外の原因で凝固時間が延長された検体（例えば、抗凝血試薬であるヘパリン含有検体）の場合にはほぼ1であるのに対し、抗リン脂質抗体を含有する検体では、その含有量にもよるが、一般に1.2以上の値を示す。

【００４１】

測定対象となる被検体としては、患者から採取した血液、血漿のほか、正常血漿との混合物を検体としてもよい。一般的な血液凝固測定系で調製される血液由来物質を被検体として測定可能である。従って、被検体より採血、又はヘパリン等の抗凝固剤を添加して採血して得た血液試料を、遠心分離などの常法に基づき成分分離して得られた血漿ないし血清成分でも適用可能である。非ヒト由来抗体等は、抗凝血剤とは親和性を示さないので、抗凝血剤による第１凝固時間への影響はほとんど無いと考えられるからである。また、測定法に起因する非特異的吸着を抑制し、より高精度の測定とするために、この血漿及び血清成分をさらに超遠心分離により分離して特定画分としたものを用いてもよい。被検物と凝固時間測定試薬とを混合した状態で、pH6～8、塩濃度1～500mMとなるようにすることが好ましい。

【００４２】

凝固時間測定試薬と検体との接触工程は、第１凝固時間に含有される非ヒト由来抗体等が抗リン脂質抗体と反応結合するのに十分な時間、両者を接触させておくことが好ましい。具体的には、1～30分、好ましくは2～10分、より好ましくは約5分程度である。接触工程は、30～40℃で行うことが好ましい。

【００４３】

〔免疫測定方法の適用〕

抗リン脂質抗体を捕捉する非ヒト由来抗体等を用いることにより、検体中の抗リン脂質抗体量を定量することが可能となる。

すなわち、本発明の抗リン脂質抗体の測定方法は、非ヒト由来抗体等を固定化した固相に検体とを接触させ、抗リン脂質抗体に結合した標識非ヒト由来抗体等の量を測定することにより、抗リン脂質抗体(LA)の量を測定する方法である。

【００４４】

抗リン脂質抗体測定のための具体的方法としては、１ステップ法と２ステップ法があり、いずれを用いてもよい。

１ステップ法では、非ヒト由来抗体等（一次抗体）を固定化した固相に、検体と標識された非ヒト由来抗体等（標識二次抗体）を加え、インキュベート（例えば、4～40℃で１分～１日間）して、一次抗体－検体（抗リン脂質抗体）－標識二次抗体の複合体を生成させる。複合体を構成しなかった標識非ヒト由来抗体等を取り除いた後、前記複合体の標識非ヒト由来抗体等の量を測定することにより、抗リン脂質抗体を定量する。

【００４５】

２ステップ法では、非ヒト由来抗体等（一次抗体）を固定化した固相に、検体を加えてインキュベート（例えば、4 ～40 ℃で1 分～2 時間）した後、洗浄する。次に、標識された非ヒト由来抗体等（標識二次抗体）を加えてインキュベート（例えば, 4 ～40 ℃で1 分～2 時間）することにより、一次抗体に結合した検体と反応させて、一次抗体－検体（抗リン脂質抗体）－標識二次抗体の複合体を生成させる。検体と結合しなかった余剰な標識二次抗体を洗浄して取り除いた後、前記複合体の標識非ヒト由来抗体等の量を測定することにより、抗リン脂質抗体を定量する。

【００４６】

固相としては、マイクロタイタープレートやポリスチレンビーズなどを使用することができ、非ヒト由来抗体を固相に固定化する方法としては、非ヒト由来抗体等を緩衝液に溶解し、これを固相に接触させて、4 ℃で一晩以上放置すればよい。固相一面に、抗体等が均一にコートされているとは限らないため、牛血清アルブミンをトリス緩衝液に溶解し、これを固相に接触させ，同様にしてコートしておくことが好ましい。

【００４７】

また、標識二次抗体を用いるかわりに、非標識二次抗体を用いて、まず一次抗体－検体（抗リン脂質抗体）－非標識二次抗体の複合体を形成し、その後、該複合体の非標識二次抗体に標識を結合させてもよい。標識を結合させる方法としては、アビジン－ビオチン複合体生成反応を利用する方法がある。

【００４８】

前記標識としては、アルカリホスファターゼやペルオキシダーゼなどの酵素や、蛍光発色物質、化学発光物質、アイソトープなどを用いることができる。

【００４９】

標識等の定量方法は、標識の種類に応じて、当該分野で公知の方法を使用できる。例えば、酵素で標識した場合には酵素活性を測定することにより、蛍光発色物質で標識した場合には蛍光光度計により測定することができ、化学発光物質で標識した場合には酵素を用いた化学発光により測定することができ、ラジオアイソトープで標識した場合にはシンチレーションカウンターを用いることにより測定することができる。また、発色性基質を利用した酵素反応としては、例えば、アルカリホスファターゼで標識した場合にはｐ－ニトロフェニルホスフェートを、ペルオキシダーゼで標識した場合には2'-アジノ-ビ-(3'-エチルベンジルチアゾリンスルホン酸）を基質として用い、一定時間反応させて生成する生成物を分光光度計で比色すればよい。

【実施例】

【００５０】

以下本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【００５１】

（実施例１）試薬の調製方法

エラグ酸溶液(0.1mM)に50mM HEPES及び25mM Tris 緩衝液(pH7.35)を混合し、リン脂質として、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)及びホスファチジルコリン(PC)を混合して、PS:5μg/mL、PE:20μg/mL、PC:70μg/mLの第２凝固時間測定試薬の第１部分試薬を調製した。

【００５２】

上記で調製した第２凝固時間測定試薬に、Scantibodies社から異好性阻止試薬として市販されているHBRを、400μg/mLの濃度となるように添加して、第１凝固時間測定試薬の第１部分試薬を調製した。HBRは、マウス由来のIgGを主成分とするものである。

（測定方法）

【００５３】

測定用検体として、正常血漿（シスメックス社製のコアグトロールＮ）、LA陽性患者血漿、ワーファリン投与患者血漿、ヘパリン投与患者血漿、第VIII因子欠乏患者血漿を用いた。患者検体は、NIBSC、ジョージキングバイオメディカル社、グラディポア社、ADI社、サンフコ社からの市販品を用いた。

【００５４】

上記各測定試料(50μL)と上記で調製した第１凝固時間測定試薬の第１部分試薬又は第２凝固時間測定試薬の第１部分試薬を各50μLとを混合し、37℃で5分間加温した後、それぞれに第２部分試薬及び第４部分試薬として、25mM/Lの塩化カルシウム液を50μLとなるように添加して、凝固を開始させた。凝固時間は、全自動血液凝固分析装置コアグレックス800（島津製作所製）を用いて測定した。測定は各２回行なった。結果を表１に示す。

【表１】

検体	異好性阻止物質(HBR)		阻害比率
	無添加	添加	
正常血漿1	27.1	26.7	1.01
正常血漿2	29.1	28.8	1.01
正常血漿3	28.4	28.1	1.01
LA血漿1	47.6	38.1	1.25
LA血漿2	60.7	34.1	1.78
LA血漿3	83.5	37.5	2.23
LA血漿4	53.6	33.7	1.59
LA血漿5	66.2	36.7	1.80
ヘパリン血漿1	45.6	44.6	1.02
ヘパリン血漿2	70.2	71.2	0.99
ワーファリン血漿1	65.2	66.6	0.98
ワーファリン血漿2	43.7	44.1	0.99
第Ⅷ因子欠損	80.3	81.2	0.99
第Ⅸ因子欠損	91.2	92.5	0.99

(単位:秒)

表１から、LA含有血漿は、HBRを含有する第１凝固時間測定試薬に対する凝固時間（第１凝固時間）が、HBRを含有しない第２凝固時間測定試薬に対する凝固時間（第２凝固時間）と比べて、有意に凝固時間が短縮した。従って、HBRはヒトLAと選択的に結合して、凝固系組成物による凝固時間の延長を阻止したと考えられる。

【００５５】

一方、正常血漿、ヘパリン血漿、ワーファリン血漿、第VIII因子欠損血漿及び第IX因子欠損血漿については、第１凝固時間と第２凝固時間の間に、有意な差異が認められなかった。HBRは正常血漿の凝固系に影響を及ぼさないことが確認できる。また、抗凝血薬が添加されたサンプル（ヘパリン血漿、ワーファリン血漿）、凝固因子欠損（第VIII因子欠損血漿及び第IX因子欠損血漿）により凝固時間が延長される場合であっても、抗リン脂質抗体依存性による延長でない場合には、第１凝固時間と第２凝固時間に有意な差異が認められないことがわかる。

【００５６】

（実施例２）

LAに対して感度の高い市販APTT試薬である、トロンボチェックAPTT-SLA（シスメックス社製）を使用し、これにHBRを添加して、表２に示すような最終HBR濃度を有する第１凝固時間測定試薬を調製した。尚、HBR 0μgとあるのは、HBRを含有しない第２凝固時間測定試薬に該当する。

測定試料として、検体と正常血漿との1:1混合物50μLを用いた。測定試料に、HBR含有濃度が異なる凝固時間測定試薬を添加し、各濃度の凝固時間測定試薬についての凝固時間を求めた。

測定は、全自動血液凝固分析装置コアグレックス800（島津製作所製）を用いて、２回行なった。その結果を表２及び図１に示す。また、得られた凝固時間について、HBR濃度0μgの場合の凝固時間（２凝固時間に該当）に対して、HBR各濃度の場合の凝固時間（第１凝固時間に該当）の阻害比率を下記式に基づいて算出した阻害比率を表３に示す。

阻害比率　＝１－（第２凝固時間－第１凝固時間）／第１凝固時間

【表２】

検体	HBR 濃度（μg/テスト）					
	0	2	5	10	20	30
正常血漿1	27.2	26.9	26.5	26.1	26.1	26.1
正常血漿2	29.4	29.5	29.4	29.1	29.3	29.2
LA1	48.5	43.3	38.0	37.1	37.7	37.4
LA2	43.7	39.2	34.7	35.3	35.2	35.6
LA3	39.9	36.5	33.0	32.2	32.1	32.7
LA4	40.1	36.3	32.5	32.0	33.0	33.5
LA5	39.5	36.4	33.3	32.5	29.6	28.8
ヘパリン1	34.2	33.8	33.4	33.3	33.0	33.6
ヘパリン1	45.2	44.6	45.1	44.8	45.1	45.0
ワーファリン1	42.1	41.9	42.0	42.1	42.1	42.0
ワーファリン2	49.5	49.6	49.1	49.2	49.3	49.1
第Ⅷ因子欠損	33.2	33.1	33.3	33.2	32.9	33.0
第Ⅸ因子欠損	31.3	30.9	30.5	30.3	30.3	30.2

（単位:秒）

【表３】

検体	HBR 濃度（μg/テスト）					
	0	2	5	10	20	30
正常血漿1	1.00	1.01	1.03	1.04	1.04	1.04
正常血漿2	1.00	1.00	1.00	1.01	1.00	1.01
LA1	1.00	1.12	1.28	1.31	1.29	1.30
LA2	1.00	1.11	1.26	1.24	1.24	1.23
LA3	1.00	1.09	1.21	1.24	1.24	1.22
LA4	1.00	1.10	1.23	1.25	1.22	1.20
LA5	1.00	1.09	1.19	1.22	1.33	1.37
ヘパリン1	1.00	1.01	1.02	1.03	1.04	1.02
ヘパリン1	1.00	1.01	1.00	1.01	1.00	1.00
ワーファリン1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
ワーファリン2	1.00	1.00	1.01	1.01	1.00	1.01
第Ⅷ因子欠損	1.00	1.00	1.00	1.00	1.01	1.01
第Ⅸ因子欠損	1.00	1.01	1.03	1.03	1.03	1.04

（阻害比率）

表２及び図１から、ヒトLA含有血漿では、HBRの濃度依存的に凝固時間が短縮すること、LAと非ヒト由来抗体(HBR)との反応性が定量的に行われることがわかる。一方、正常血漿、ヘパリン血漿、ワーファリン血漿、第VIII因子欠損血漿及び第IX因子欠損血漿については、HBR添加濃度の違いによる凝固時間の有意な違いは認められなかった。また、図１及び表３から、LA陽性検体50μLサンプルに対し、HBR5μg以上（サンプルに対するHBR濃度0.1mg/mL）の場合に阻害比率が1.2以上を示すことがわかる。

【００５７】

（実施例３）

由来する脊椎動物の種類と、ヒトLAに対する親和性との関係を調べた。

実施例２において、HBRに代えて、表４に示す各種脊椎動物の血清を2mg/mLで含有する第１凝固時間測定試薬を調製し、この第１凝固時間測定試薬と5倍希釈血清とを9:1の割合で混合した。検体として、２人の異なるLA陽性患者の血漿を用いた。また、牛由来血清としてGIBCO 38N2351、トリ由来血清としてGIBCO 35K3466カラム精製品、マウス由来血清としてGIBCO 1910DM、馬血清としてGIBCO 9M0644を用いた。

実施例２と同様にして、全自動血液凝固分析装置コアグレックス800（島津製作所製）を用いて、凝固時間を測定した。結果を表４に示す。尚、コントロールとして、脊椎動物血清を含有させていない第２凝固時間測定試薬を用いた場合の第２凝固時間を示す。また、各種抗体を用いた場合について、上記式に基づいて算出される阻害比率を、表５に示す。

【表４】

（単位:凝固時間）

検体	対象	動物血清									HBR
		ウシ	トリ	ウサギ	ブタ	ヒツジ	マウス	ウシ胎児	ウマ	ヤギ	
正常試料	26.0	26.3	27.0	26.4	29.2	26.8	27.8	26.0	27.4	26.8	26.3
LA陽性患者1	52.0	41.3	55.5	53.0	57.6	50.5	44.1	49.5	49.9	50.5	42.1
LA陽性患者2	63.6	45.9	63.6	56.0	67.4	56.4	44.8	57.8	47.3	56.2	45.3

【表５】

（単位:阻害比率）

検体	対象	動物血清									HBR
		ウシ	トリ	ウサギ	ブタ	ヒツジ	マウス	ウシ胎児	ウマ	ヤギ	
正常試料	1.00	0.99	0.96	0.98	0.89	0.97	0.94	1.00	0.95	0.97	0.99
LA陽性患者1	1.00	1.26	0.94	0.98	0.90	1.03	1.18	1.05	1.04	1.03	1.24
LA陽性患者2	1.00	1.39	1.00	1.14	0.94	1.13	1.42	1.10	1.34	1.13	1.40

表４、５より、非ヒトほ乳類由来血清については、LA陽性患者検体Ｎｏ．１、２のいずれも１以上の阻害比率を示したが、トリ由来血清では感度の悪い検体Ｎｏ．１に対して阻害比率が１以下であった。

【００５８】

（実施例４）非ヒト由来抗体等(HBR)を用いた免疫学的測定方法

（ELISAの系によるLAの測定法）

HBR(Scantibodies社製)を0.1%NaN_3・0.1 Mリン酸緩衝液(pH7.5)で希釈して、HBR濃度20μg/mLの免疫学的測定用試薬を調製した。この試薬を、100μL/wellを96穴のマイクロプレートの各ウェルに添加し、冷蔵一夜感作した。その後、洗浄液(0.05%Tween20・PBS(pH7.0))で洗浄し、１％ ウシ血清アルブミン(BSA)含有した50mM PBS (pH7.4) を添加した。1% BSAを含有した50mM PBS (pH7.4) で20倍に希釈した抗リン脂質抗体症候群(APS)患者又はLA陽性患者血漿100μLを、HBRを固定化させたプレートに添加し、室温で30分間反応させて、検体をHBRに結合させた。洗浄後、ビオチンを結合したHBR(0.1μg/mL)を加え、更に室温で30分間反応させて、HBR－検体－ビオチン結合HBR複合体を生成させた。複合体を形成しなかったビオチン結合HBRを除去し、洗浄した後、ストレプトアビジン標識ペルオキシダーゼ(10mU/mL)100μLを添加し、室温で30分反応させて、ビオチン結合HBRを酵素標識した。ビオチンHBRに結合しなかったペルオキシダーゼを除去し、洗浄した後O-フェニレンジアミン(OPD)基質液を加え、室温で15分反応後、反応停止液（2 N硫酸)100μLを加えた。分光光度計（主波長：492nm、副波長：690nm)で比色した。結果を表６に示す。

【表６】

検体	吸光度 Abs 490/690 nm
正常血漿１	０．０４３
正常血漿２	０．１０４
ＬＡ１	１．８１３
ＬＡ２	３．４５２
ＬＡ３	２．８９６
ＬＡ４	１．３０８
ＬＡ５	２．５５８
ヘパリン１	０．２３０
ヘパリン２	０．０７３
ワーファリン１	０．４０３
ワーファリン２	０．０９８
第Ⅷ因子欠損血漿	０．１１２
第Ⅷ因子欠損血漿	０．３２９

ヒトLA含有血漿では、吸光度は1.308～3.452であったが、正常血漿、ヘパリン血漿、ワーファリン血漿、第VIII因子欠損血漿及び第IX因子欠損血漿については、吸光度は0.084～0.403の範囲であった。このことより、HBRが抗リン脂質抗体、特にLAに特異的に結合していることが確認できる。従って、吸光度とLA量の関係を利用することにより、LA量を定量することが可能となる。

【産業上の利用可能性】

【００５９】

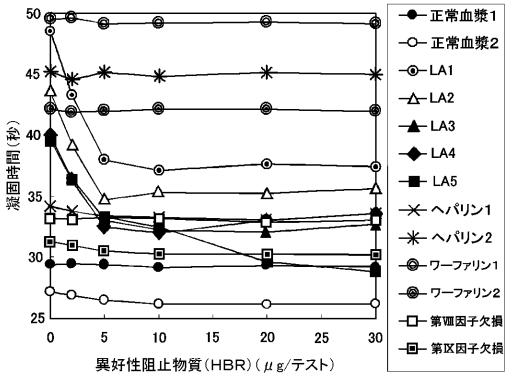
抗リン脂質抗体症候群の原因物質である抗リン脂質抗体、特にLAが、非ヒト由来抗体等と特異的に結合し、抗リン脂質抗体と検体に含まれているリン脂質との結合を阻止することを見出し、抗リン脂質抗体症候群の原因物質である抗リン脂質抗体、具体的にはLAを、高精度に検出できる凝固時間測定試薬、試薬キット、検体中の抗リン脂質抗体を定量可能な程に、特異的に測定する方法を提供することが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【００６０】

【図１】実施例２の測定結果（各検体のHBR濃度と凝固時間の関係）を示すグラフである。

【図１】


50
45
40
35
30
25
凝固時間（秒）
0
5
10
15
20
25
30
異好性阻止物質（HBR）（μg/テスト）
正常血漿1
正常血漿2
LA1
LA2
LA3
LA4
LA5
ヘパリン1
ヘパリン2
ワーファリン1
ワーファリン2
第Ⅷ因子欠損
第Ⅸ因子欠損